J. of Korean Oil Chemists' Soc.,
Vol. 33, No. 2. June, 2016. 333~341
ISSN 1225-9098 (Print)
ISSN 2288-1069 (Online)
http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2016.33.2.333

산수유 종자 추출물의 화장품 방부효능에 관한 연구

양재찬†

목원대학교 테크노과학대학 생의약화장품학부
(2016년 2월 22일 접수; 2016년 5월 17일 수정; 2016년 6월 20일 채택)

A Study on the Cosmetic Preservative Effects of *Cornus officinalis* seed Extracts

Jae-Chan Yang†

Mokwon University, College of Sciences & Technology, Division of Biomedicinal & Cosmetics, Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 302-729, Korea
(Received February 22, 2016; Revised May 17, 2016; Accepted June 20, 2016)

요 약 : 산수유 종자 추출물의 천연 방부제로서 가능성을 평가하기 위하여 항균활성 및 화장품 방부효능 평가를 실시하였다. 산수유 종자는 각각 1,3-부틸렌글리콜과 에탄올을 이용하여 추출하였다. Paper disc method로 항균활성을 평가한 결과 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*와 *Propionibacterium acnes*에서 항균활성이 나타났으며 산수유 종자 1,3-부틸렌글리콜 추출물(COS-A)이 여드름균에대해 26.7±4.0mm로 가장 높았다. 최소저해농도(MIC) 측정 결과 산수유 종자 에탄올 추출물(COS-B)이 가장 낮은 농도에서 *S. epidermidis*균의 생장을 억제하였다. 에멀션에서의 방부효능 평가를 위해 Challenge test를 실시한 결과 COS-A와 COS-B를 첨가한 에멀션에서 균 접종 7일 후 피부상재균이 100% 사멸되었다. 이러한 결과는 산수유 종자 추출물이 화장품에서 합성방부제를 대체할 천연 방부제로서 가능성이 있을 것으로 사료된다.

주제어 : 산수유, 항균, 천연방부제, 최소저해농도, 화장품 방부효능

Abstract : To evaluate the possibility as a natural preservative of *Cornus officinalis* seed extracts, we investigated the anti-microbial activity and preservation effect of cosmetics. *Cornus officinalis* seed extracted with 1,3-Butylene Glycol(1,3-BG) and Ethanol(EtOH). As a result, *Cornus officinalis* seed extracts showed anti-microbial activity at *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* and *Cornus officinalis* seed 1,3-BG extracts(COS-A) showed 26.7±4.0mm clear zone at the 1000.0 μl/ml. Minimum inhibitory concentration of *S. epidermidis* was observed at *Cornus officinalis* seed EtOH extracts(COS-B) 25.0 μl/ml. The result of challenge test for preservation effect on cosmetics, *S. aureus* and *S. epidermidis* was 100% eliminated from

†Corresponding author
(E-mail: rabbit@mokwon.ac.kr)

emulsion containing COS-A and COS-B after 7 days. These results suggest that *Cornus officinalis* seed extracts may have possibility as the natural preservative instead of synthetic perservative on cosmetics.

Keywords : Cornus officinalis, anti-microbial, natural preservative, MIC, challenge test

1. 서 론

화장품 사용에 있어서 원료의 오염, 제조 공정과 포장에 따른 오염, 불충분한 방부 시스템 등은 화장품의 미생물 오염을 초래할 수 있다[1]. 화장품 중 많은 제품인 에멀션은 유성성분을 내상으로 하고 수성성분을 외상으로 하는 O/W제형과 그의 반대인 W/O제형 또는 계면활성제로 이루어진 막으로 내상과 외상이 구분된 형태인 O/W/O, W/O/W 등의 다중에멀션 제형이 있으며[2] 동·식물유, 광물유, 글리세린, 솔비톨을 비롯하여 아미노산 유도체와 단백질과 같은 미생물의 영양원이 풍부하므로 세균과 곰팡이 등 미생물 오염에 노출되기 쉽다[3,4]. 제형에 따라서는 수성성분이 외상인 O/W제형이 W/O제형보다 미생물 오염에 더 취약하다.

화장품이 미생물에 의해 오염이 되면 변색, 변취, 점도 및 pH 변화 등의 품질저하 현상이 나타난다. 이는 표면 또는 내용물에서 미생물이 증식하면서 호흡, 대사, 효소작용 등의 화학작용과 생분해작용을 함으로써 일어나는 현상이다. 곰팡이의 경우 표면에 콜로니를 형성하고 대사 작용에 의해 pH가 변하게 되며 오염된 미생물이 분비하는 색소에 의해 제품의 변색이 일어난다. 미생물의 대사과정 중 당분의 소모에 의해 점도가 변하기도 하며 입자가 응고되어 에멀션의 층이 분리되기도 한다[5]. 사용 중 오염에 의해 품질변화를 일으키는 화장품을 장기간 보호하기 위해서 방부제는 사용되어질 수밖에 없으며[6], 화장품은 의약품과는 달리 피부에 반복적, 장기간 사용하는 제품이므로 방부제에 대한 더 많은 필요성을 갖고 있다[7]. 따라서 제품의 미생물에 대한 안정성 확보 및 적절한 방부 시스템은 화장품 제조 기술에 있어서 중요한 부분을 차지한다.

현재 대부분의 화장품은 합성방부제에 의존하고 있으며 그 기능은 제품내에 미생물의 생육을 저해함으로써 제품에 안전성과 안정성을 부여하는 것이다[7]. 합성방부제의 종류로는 파라벤(Paraben)류, 쿼터늄-15(Quaternium-15), 이미다졸리디닐우레아(Imidazolidinylurea), 클로로페네신(Chlorphenesin), 페녹시에탄올(Phenoxy-ethanol)과 MCI(Methylchloroisothiazolinone)/MI(Methylisothiazolinone)계열 등이 있다. 이들 합성방부제는 우수한 항균 활성과 더불어 가격에 대한 경쟁력이 있는 반면[8] 장기간 고농도로 사용 시 피부 자극이나 인체 독성을 나타낼 수 있다.

파라벤류 방부제는 화장품에서 대표적으로 사용되는 방부제이며 메틸파라벤, 에틸파라벤, 프로필파라벤, 뷰틸파라벤 등이 있고, 특히 메틸파라벤과 프로필파라벤의 혼합물이 가장 널리 사용된다. 파라벤류 방부제는 무색, 무취, 불휘발성의 백색 파우더 형태이고 화학적으로 안정하며 폭넓은 pH영역에서 효과를 발휘하는 장점이 있으며 낮은 농도에서도 곰팡이에 대한 살균 작용이 효과적이다[9]. 이미다졸리디닐우레아는 세균에 대한 활성이 좋고 클로로페네신과 페녹시에탄올 등의 알코올류 방부제는 값이 싸고 다양한 미생물에 효과적이다. MCI와 MI등의 이소치아졸 화합물은 연한 호박색을 띄고 부드러운 냄새가 나며 맑은 액상의 물질로 낮은 농도에서도 다양한 미생물에 효과적으로 작용하는 장점이 있다[8]. 그러나 이들 합성방부제는 체내에 축적되면 내분비계 교란을 일으키고 알레르기를 유발하기도 하며 접촉성 피부염이나 알레르기 등 피부자극을 일으킨다는 단점이 있다[10]. 이에 따라 합성방부제의 부작용을 극복하기 위한 대체제 개발 필요성이 증가되면서 천연 항균 물질을 주요 성분으로 함유한 천연방부제 개발을 위한 연구들이 진행되어 왔다[11]. 현재 천연방부제로 향신료와 유기산, 저급지방산, 라이소자임, 락토페린 등이 알려져 있으며 실용화 되어있는 천연항균제로는 자몽종자 오일(Grapefruit Seed Extract; GSE) 70%와 glycerin 30%로 제조된 DF-100(Chemi-research, USA)이 있다[12].

산수유(*Cornus officinalis*)는 층층나무과에 속

하는 낙엽활목으로 아시아지방이나 우리나라 남부지역에 많이 분포하며 예로부터 한방에서 이용되는 약용식물로 한국에서는 식용, 약재 또는 차로 이용한다. 산수유는 다뇨, 요통, 이명, 폐결핵 등의 치료효과와 신경안정, 이뇨작용 등의 효능이 있으며[13] 동의학에서는 산수유가 간경, 신경에 좋으며 혈압강하작용, 항암작용, 항균작용 등이 있다고 하였다[14]. 산수유에는 말산(malic acid), 주석산(tartaric acid), 구연산(citric acid) 등의 유기산과 우르솔릭산(ursolic acid), 올레아놀릭산(oleanolic acid) 등의 트리테르펜(triterpene)화합물이 있으며 모로니사이드(morroniside), 스웨로사이드(sweroside), 로가닌(lo-ganin) 등의 배당체가 있다[15,16]. 산수유는 전국적으로 재배면적 및 생산량이 해마다 증가하고 있으며 수출입 동향역시 증가하고 있는 추세이나, 우리나라에서는 그 이용도가 주로 과실만을 이용한 한약재나 일부 식품가공품에만 국한되어 있고 종자는 버려지는 실정이다[17,18]. 따라서 본 연구에서는 천연부산물인 산수유 종자 추출물을 이용하여 화장품에 발생하기 쉬운 세균 및 진균에 대하여 항균활성을 평가하고 이를 화장품 에멀션 제형에 적용하여 방부력을 평가함으로써 산수유 종자 추출물이 화장품의 천연 방부제로서 사용될 수 있는 가능성을 탐색하고자 하였다.

2. 실 험

2.1. 실험 재료

2.1.1. 재료

본 실험에서 사용한 산수유 종자는 전라남도 구례군에 위치한 구례 산수유 영농조합법인으로부터 제공 받아 사용하였다. 각 추출물은 30% 1,3-Butylene glycol(1,3-BG)과 5% EtOH을 용매로 하여 산수유 종자와 각각 1:5, 1:20의 비율로 추출하였으며 액상 형태로 4℃에 보관하면서 *in vitro* 실험에 사용하였다.

2.1.2. 사용 균주 및 배지

시험에 사용한 균주는 그람양성균 2종과 그람음성균 1종 및 진균 2종을 사용하였다. 그람양성균 중 피부상재균인 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*, KCTC 1927), *Staphylococcus epidermidis*(*S. epidermidis*, KCTC 1917)와 그람음성균 중 대장균인 *Escherichia coli*(*E. coli*, KCTC 2571), 진균인 *Candida albicans* (*Candida. A*, KCTC 7270)와 *Propionibacterium acnes*(*P. acnes*, KCTC 3314)를 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Korea)에서 구입하여 계대배양하며 사용하였다. *S. aureus, S. epidermidis, E. coli*는 Tryptic Soy Agar(TSA, BD)와 Tryptic Soy Broth(TSB, BD)를 사용하였고 *P. acnes*는 Reinforced clostridial agar(RCA, Merck)와 Differential reinforced clostridial broth(DRCM, Merck)를 사용하였으며 *Candida. A*는 Potato Dextrose Agar(PDA, BD)와 Potato Dextrose Broth(PDB, BD)를 이용하여 배양하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 생육저해환 측정(Paper disc method)

산수유 종자 추출물의 항균 효과는 Paper disc method를 이용하여 측정하였다. 시험에 사용된 세균 및 진균은 37℃에서 24시간 동안 전 배양하여 활성화시킨 뒤 새 액체배지에 1백금이량을 희석하여 사용하였다. 멸균된 면봉을 이용하여 균 배양용 한천평판배지(agar plate)에 균 희석액을 고르게 도말하고 8mm Paper disc(Advantec, Japan) 위에 농도별 추출물을 35.0㎕씩 분주한 다음 37℃의 incubator에서 24시간 배양하여 Paper disc 주위에 생성된 생육저해환(Clear zone, mm)의 직경으로 각 균에 대한 추출물의 항균력을 측정하였다.

2.2.2. 최소저해농도 측정(Minimum inhibitory concentration, MIC)

산수유 종자 추출물의 최소저해농도는 broth-dilution method[19]를 이용하여 측정하였다. 세균 및 진균은 37℃에서 24시간 동안 전 배양하여 활성화시킨 뒤 새 액체배지에 1백금이량을 희석하여 사용하였다. 시험에 사용된 시료농도는 각 추출물의 용해도에 따라 1% DMSO 용액에 용해하여 stock solution을 제조한 후 액체배지와 serial dilution 하여 사용하였다. 96-well plate에 각 well당 최종 농도가 50.0, 25.0, 12.5, 6.3㎕/ml 이 되도록 시료 100.0㎕를 분주하고 균 희석액 100.0㎕를 첨가한 후 ELISA reader (Molecular Devvices, USA)를 이용해 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 96-well plate를

37℃에서 48시간 동안 배양하며 배양 시작을 기준으로 12, 24, 48시간에 흡광도를 측정하였으며 흡광도의 증가가 나타나지 않는 농도를 MIC로 설정하였다.

2.2.3. Chanllenge test

산수유 종자 추출물의 화장품 제형에 대한 방부력은 Challenge test를 이용하여 측정하였다[20], 실험 시료로 산수유 종자 추출물을 2.00% 함유한 에멀션을 사용하였으며 양성대조군으로는 합성방부제인 Methylparaben(M.P) 0.25%와 Propylparaben(P.P) 0.10%를 함유한 에멀션을 사용하였다(Table 1). 시험에 사용된 균주는 37℃에서 24시간 동안 전 배양하여 활성화시킨 뒤 Optical density(O.D)=0.2가 되도록 새 액체배지에 희석하여 사용하였다. 제조한 에멀션 100g에 희석 균주를 100.0㎕ 접종한 뒤 액체배지와 1 : 9 비율로 희석하여 균질화하였다. 한천평판배지에 검체를 100.0㎕ 접종하고 멸균 spreader로 고르게 도말한 뒤 37℃에서 24시간 배양하여 균 접종 0, 1, 3, 5, 7일차에 형성된 균의 집락 수(colony)를 측정하여 균주의 사멸 정도를 측정하였다. 미국화장품협회(Cosmetic, Toiletry & Fragrance Association, CTFA)의 guidelines 에 따라 7일 후 균 수가 처음 균 수 보다 99.9% 사멸하는지를 관찰하여 방부력을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 생육저해환 측정(Paper disc method)

세균 및 진균에 대한 산수유 종자 추출물의 항균력을 측정하기 위해 각각의 추출물을 10.0, 100.0, 300.0, 500.0, 1000.0㎕/ml의 농도로 생육저해환(Clear zone)을 측정하였으며 그 결과는 Table 2와 같다. 실험에 사용된 균주에 대하여 모든 산수유 종자 추출물에서 농도 의존적으로 항균활성이 나타났으며, 5가지 균주에 대한 산수유 종자 추출물의 항균활성은 균주마다 차이를 보였다. 실험에 사용된 시료의 농도 중 최저 농

Table 1. Formulation of the emulsion containing *Cornus officinalis* seed extracts

INCI Name	Content (%)			
	Control	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Cetostearyl alcohol	0.90	0.90	0.90	0.90
Glyceryl monostearate	1.00	1.00	1.00	1.00
Glyceryl stearate	0.80	0.80	0.80	0.80
Polyglyceryl-3 methylglucose distearate	1.50	1.50	1.50	1.50
Propyl paraben	0.10	-	-	-
Hydrogenated polydecene	4.50	4.50	4.50	4.50
Caprylic/Capric triglyceride	2.00	2.00	2.00	2.00
Cetearyl isononanoate	2.00	2.00	2.00	2.00
Water	Up to 100	Up to 100	Up to 100	Up to 100
Glycerin	3.00	3.00	3.00	3.00
Dipropylene glycol	4.00	4.00	4.00	4.00
Carbomer 941	0.13	0.13	0.13	0.13
Ethylenediaminetetraacetic acid	0.03	0.03	0.03	0.03
Methyl paraben	0.25	-	-	-
Triethanolamine	0.15	0.15	0.15	0.15
Cornus officinalis seed extracts-A(COS-A)[1)]	-	2.00	-	-
Cornus officinalis seed extracts-B(COS-B)[2)]	-	-	2.00	-
Cornus officinalis seed extracts-C(COS-C)[3)]	-	-	-	2.00

[1)] : *Cornus officinalis* seed 1,3-BG 1 : 5 extracts
[2)] : *Cornus officinalis* seed 5% EtOH 1 : 5 extracts
[3)] : *Cornus officinalis* seed 5% EtOH 1 : 20 extracts

Table 2. Clear zone of *Cornus officinalis* extracts by paper disc method (Unit: mm)

Microorganism	Concentrations(μl/ml)				
	10	100	300	500	1000
COS-A[1)]					
S. aureus	–[4)]	17.7±3.0	21.8±2.0	25.8±3.0	26.8±2.0
S. epidermidis	–	19.0±2.0	22.3±1.0	23.0±3.0	26.0±3.0
E. coli	–	16.7±1.0	20.0±2.0	21.7±2.0	23.3±3.0
Candida. A	–	–	–	–	–
P. acnes	16.7±2.0	18.0±0.0	23.0±0.0	26.0±6.0	26.7±4.0
COS-B[2)]					
S. aureus	–	17.7±3.0	22.3±1.0	23.7±1.0	25.7±3.0
S. epidermidis	–	17.3±1.0	21.0±0.0	22.0±2.0	26.0±3.0
E. coli	–	18.3±1.0	20.0±2.0	22.3±2.0	24.7±3.0
Candida. A	–	–	–	–	–
P. acnes	–	18.7±4.0	22.7±3.0	24.0±4.0	25.0±4.0
COS-C[3)]					
S. aureus	–	16.7±2.0	18.7±2.0	20.0±3.0	22.7±1.0
S. epidermidis	–	16.7±2.0	18.0±3.0	19.7±3.0	21.0±2.0
E. coli	–	17.3±2.0	17.7±1.0	19.7±3.0	20.3±1.0
Candida. A	–	–	–	–	–
P. acnes	19.0±0.0	19.3±1.0	21.7±2.0	21.3±3.0	22.3±2.0

1) : *Cornus officinalis* seed 1,3-BG 1 : 5 extracts
2) : *Cornus officinalis* seed 5% EtOH 1 : 5 extracts
3) : *Cornus officinalis* seed 5% EtOH 1 : 20 extracts
4) : No Inhibition (no clear zone)

도인 10.0μl/ml에서 *S. aureus, S. epidermidis, E. coli* 균주에 대해서는 항균 활성이 없었으나 여드름균인 *P. acnes* 에서는 COS-A와 COS-C가 각각 16.7±2.0, 19.0±0.0mm로 생육저해환을 나타냄으로써 항균활성을 보였다. 시료 농도 중 최고 농도인 1000.0μl/ml에서 COS-A는 *S. aureus* > *P. acnes* > *S. epidermidis* > *E. coli* 순으로 항균활성을 나타내었으며 그람양성균인 *S. aureus*에서 26.8±2.0mm로 가장 높았다. COS-B에서는 *S. epidermidis* > *S. aureus* > *P. acnes* > *E. coli* 순으로 항균활성을 나타내었으며 *S. epidermidis* 균주에서 26.0±3.0mm로 가장 높은 활성을 보였다. COS-C에서는 *S. aureus* > *P. acnes* > *S. epidermidis* > *E. coli* 순으로 항균활성을 나타내어 COS-A 시료와 같은 양상을 보였으나, *S. aureus*에서 그 값이 22.7±1.0mm로 다른 시료들 보다 비교적 낮게 나타났다. 세 가지 산수유 종자 추출물 모두 그람음성균 보다 그람양성균에 대한 항균 활성이 크게 나타났으며 진균류 중 *Candida. A*에 대해서는 항균 활성이 나타나지 않았다. 또한 세가지 시료 중 폴리올인 30% 1,3-BG 를 용매로 하여 추출한 COS-A 추출물의 항균활성이 5% EtOH 각각 1:5, 1:20의 비율을 용매로 하여 추출한 COS-B와 COS-C에 비하여 높은 것으로 나타났다. 산수유 과육과 종자 추출물의 항균활성에 대한 보고에서는[21] 그람양성과 그람음성균에서는 항균활성이 나타났으나 일부 진균 및 효모균에서는 항균활성이 약하게 나타났다고 보고하였다. 본 연구에서도 산수유 종자 추출물의 항균활성이 각 균주마다 차이를 보이나, 일부 진균보다 그람양성균 및 그람음성균에 대하여 더 큰 것으로 나타나 선행 연구와 일치하는 경향을 보였다.

3.2 최소저해농도 측정(Minimum inhibitory concentration, MIC)

산수유 종자 추출물의 세균에 대한 항균력을 최소저해농도 측정을 통해 평가하였으며 그 결과는 Table 3과 같다. 최소저해농도인 MIC는 세균 발육 저지에 필요한 최소농도를 말한다[22].

Table 3. Minimum inhibitory concentration of *Cornus officinalis* seed extracts for *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. coli*

Microorganism	Sample (μl/ml)			
	M.P (μg/ml)	COS-A[1)]	COS-B[2)]	COS-C[3)]
S. aureus	1000.0	50.0	50.0	50.0
S. epidermidis	1000.0	50.0	25.0	50.0
E. coli	1000.0	-	-	50.0

[1)] : *Cornus officinalis* seed 1,3-BG 1 : 5 extracts
[2)] : *Cornus officinalis* seed 5% EtOH 1 : 5 extracts
[31)] : *Cornus officinalis* seed 5% EtOH 1 : 20 extracts

COS-A 추출물의 *S. aureus* 및 *S. epidermidis*균에 대한 MIC는 50.0μl/ml이며 *E. coli* 균에서는 뚜렸한 생육저해농도를 보이지 않았다. COS-B 추출물의 *S. aureus* 및 *S. epidermidis*균에 대한 MIC는 각각 50.0μl/ml, 25.0μl/ml로 *S. epidermidis*에서 *S. aureus*보다 더 낮은 농도에서 균의 생장을 저해시켰다. COS-C 추출물에서는 실험에 사용된 세 가지 균주인 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*에서 모두 동일한 농도의 MIC를 나타내었으며 그 값은 50.0μl/ml로 *E. coli*에 대해 뚜렸한 생육저해를 보이지 않은 COS-A와 COS-B에 비하여 항균활성이 높은 것으로 나타났다. 각 균주에 따라서는 *S. aureus*균에서 COS-A, COS-B, COS-C 시료 모두 동일한 MIC를 나타내었으며 *S. epidermidis*에 대해서는 각각 50.0μl/ml, 25.0μl/ml, 50.0μl/ml로 COS-B추출물이 다른 두 추출물에 비하여 더 낮은 농도에서 균의 생육을 저해하였다. *E. coli*에 대해서는 COS-C에서만이 50.0μl/ml의 MIC를 보였으며 이는 본 연구의 항균 활성 측정을 위한 Paper disc method에서 세 가지 추출물이 *E. coli*에 대하여 비교적 낮은 항균 활성을 나타낸 것과는 상이한 결과이다. 각 연구법에 따라 항균 활성에 차이를 보이는 이유는 시료의 전처리법과 배양에 사용된 배지의 물리적 형태에 차이가 있으므로[18] 추출물의 확산 정도나 생육의 억제 정도에 영향을 미치기 때문인 것으로 사료된다.

3.3 Chanllenge test

산수유 종자 추출물이 함유된 화장품의 방부력 평가를 위해 Challenge test를 실시하였으며 그 결과는 Table 4와 같다. COS-A 추출물을 함유한 에멀션(Sample 1)에서는 균 접종 7일 후에 *S. aureus*와 *S. epidermidis*를 100.0% 사멸시켰으며 *E. coli*는 63.9%를 사멸시켜 *S. aureus*와 *S. epidermidis*가 접종된 화장품에 대해 높은 방부력을 나타내었다. COS-B 추출물을 함유한 에멀션(Sample 2)에서도 균 접종 7일 후 *S. aureus*와 *S. epidermidis*에 대해 100.0% 사멸율을 보여 방부효능을 나타내었으나 *E. coli*는 61.8% 사멸시켜 CTFA의 기준에 미치지 못하였다. COS-C 추출물을 함유한 에멀션(Sample 3)에서는 균 접종 7일 후 *S. aureus*를 86.8%, *S. epidermidis*를 95.9%, *E. coli*를 82.7% 사멸시켜 COS-A와 COS-B 추출물이 함유된 에멀션에 비하여 낮은 방부력을 나타내었다. 진균류인 *Candida. A*에 대해서는 세 추출물이 함유된 에멀션에서 균 접종 7일 후 모두 균의 감소나 사멸이 확인되지 않아 진균류에 대해서는 방부력을 보이지 않았다. 각 균주에 따라서는 합성방부제가 첨가된 대조군에서 *S. aureus*에 대해 균 접종 7일 후 99.3%의 사멸률을 보인것에 비해 COS-A와 COS-B를 첨가한 에멀션에서 100.0% 균의 사멸률을 보여 더 높은 방부력을 보였다. *S. epidermidis*균에 대해서는 COS-A와 COS-B를 첨가한 에멀션에서 균 접종 7일 후 100.0%사멸률을 보여 합성방부제를 첨가한 대조군과 같은 방부력을 나타내었다. *E. coli*에 대해서는 대조군에서 균 접종 7일 후 100.0% 사멸률을 보인데에 비해 COS-A가 63.9%, COS-B가 61.8%, COS-C가 82.7%의 사멸률을 보여 합성방부제가 첨가된 에멀션보다 낮은 방부력을 보였다. 에멀션을 이용한 화장품 방부력 테스트에서 나타난 결과로 미루어 보아 산수유 종자 추출물이 진균류에 대하여는 방부력

Table 4. Increase and decrease rate from emulsion challenge test containing *Cornus officinalis* seed extracts

Microorganism	Sample	CFU/g of emulsion at day postchallenge		
		0	7	ER(%)[5]
S. aureus	Con.(+)[1]	436.0	7.0	99.3
	Sample 1[2]	2792.0	NA[6]	100.0
	Sample 2[3]	2000.0	NA	100.0
	Sample 3[4]	3240.0	428.0	86.8
S. epidermidis	Con.(+)	1604.0	NA	100.0
	Sample 1	3204.0	NA	100.0
	Sample 2	2704.0	NA	100.0
	Sample 3	3756.0	157.0	95.9
E. coli	Con.(+)	2472.0	NA	100.0
	Sample 1	2904.0	1048.0	63.9
	Sample 2	2744.0	1048.0	61.8
	Sample 3	3052.0	528.0	82.7
Candida. A	Con.(+)	50.0	0	100.0
	Sample 1	134.0	TNTC[7]	0
	Sample 2	134.0	TNTC	0
	Sample 3	134.0	TNTC	0

1) : Emulsion containing M.P 0.25%, P.P 0.1%
2) : Emulsion containing *Cornus officinalis* seed 1,3-BG 1 : 5 extracts
3) : Emulsion containing *Cornus officinalis* seed 5% EtOH 1 : 5 extracts
4) : Emulsion containing *Cornus officinalis* seed 5% EtOH 1 : 20 extracts
5) : Eliminatioin rates
6) : Not applicable
7) : Too Numerous to count

을 나타내지 않았으나, 30% 1,3-BG와 5% EtOH을 산수유 종자와 1:5의 비율로 추출한 COS-A와 COS-B가 그람음성균보다 그람양성균에 대하여 높은 방부력을 나타내는 것으로 조사되었다. 화장품에 사용되는 천연방부제로 적용할 때 정향추출물 또는 잔토리졸[23,24] 등과 같이 진균 및 효모균에 강한 항균 활성을 나타내는 물질과 복합처방시 합성방부제를 대체할 수 있는 원료로써 가능성이 있을 것으로 사료됨으로 추가적인 연구를 진행중에 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 천연부산물인 산수유 종자를 이용하여 30% 1,3-BG, 5% EtOH을 용매로 하여 추출한 후 항균활성 측정 및 에멀션에 적용하여 방부력을 평가하여 천연 방부제로서 사용될 수 있는 가능성을 평가하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 산수유 종자 추출물의 항균력에 대하여 Paper disc method법으로 평가한 결과 모든 산수유 종자 추출물에서 농도 의존적으로 항균활성이 나타났으며 각 균주마다 차이를 보였으나, 일부 진균보다 그람양성균 및 그람음성균에 대하여 더 큰 항균력을 보였다.

2. 균에 대한 산수유 종자 추출물의 MIC를 측정한 결과 COS-B에서 가장 낮은 농도로 *S.*

*epidermidis*균의 생장을 억제하였으며, COS-C에서 *E. coli*에 대해 50.0㎕/ml의 MIC를 보여 생육저해환측정 실험과 상이한 결과를 보였으나, 이는 시료의 전처리 및 배지의 물리적 형태 등의 영향에 따른 결과라 사료된다.

3. 산수유 종자 추출물을 에멀션 제형에 적용하여 화장품 방부효과를 측정한 결과 COS-A와 COS-B를 첨가한 에멀션에서 균접종 7일 후 그람양성균이 100.0% 사멸되어 높은 방부력을 나타내었다.

이상의 결과는 산수유 종자 추출물이 항균효능 및 화장품에서 방부효능을 나타내는 천연방부제 소재로서 유용하게 활용될 수 있는 가능성이 있다고 판단된다.

References

1. 서경희(2005). 화장품과 미생물 서울:화장품 신문사.
2. S. R. Hwang, J. O. Nam, B. J. Lee, W. H. Song, C, S, Lee. Recent Emulsion Technology in Cosmetics. KSBB Journal. 27(4), 207 (2012).
3. H. S. Cho, S. W. Kang, J. H. Kim, M. J. Choi, H. W. Yu, Euteum Park, H. S. Chun, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Combined Extracts of Galla rhois, Achyranthes japonica Nakai, Terminalia chebula Retz and Glycyrrhiza uralenesis. KSBB Journal. 29(1), 29 (2014).
4. J. H. Kim, E. J. Do, Guemsan Lee. Investigation of Anti-microbial Activity of Herbal Medicines Used as Natural Preservatives Based on the Analysis of Papers and Patents. J. Physiol & Pathol Korean Med. 29(1), (2015).
5. M. S. Ryu, J. K. Kim, N. K. Kim. Growth of Pseudomonas aeruginosa in Cosmetics(Emulsion-type) and the Effect of Antiseptics. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 7(2), 118 (1992).
6. M. S. Yoo. Effect of antiseptics for prevention of microbial contamination in cosmetics. Chemical Engineering. Sung Kyun Kwan Unversity. (1990).
7. E. M. Cho, J. T. Bae, H. B. Pyo, G. S. Lee. Antimicrobial Plant Extracts as an Alternative of Chemical Preservative: Preservative Efficacy of Terminalia chebula, Rhus japonica (gallut) and Cinnmomum cassia Extract in the Cosmetic Formular. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea. 34(4), 325 (2008).
8. J. E. Ku, H. S. Han, J. H. Song. The Recent Trend of the Natural Preservative Used in Cosmetics. Kor. J. Aesthet. Cosmetol. 11(5), 835 (2013).
9. H. S. Ahn, W. H. Nah, J. E. Lee, Y. S. Oh, M. C. Gye. Toxicity and Endocrine Disrupting Effect of Parabens. Korean J. Environ. Biol. 27(4), 323 (2009).
10. S. H. Jeong. A Review Safety Evaluations of Cosmetic Preservatives. Kor. J. Aesthet. Cosmetol. 11(5), 827 (2013).
11. S. H. Hwang, C. H. Park. Preservation of Cosmetics By Ethanol Extract of Scutellaria baicalensis GEORGE. KSBB Journal. 24(4), 347 (2009).
12. E. Y. Choi, J. S. Lee, Y. S. Choe, T. B. Choe. Study on Antimicrobial Activity of Natural Preservatives and Effect of Cosmetic Formulation on Antimicrobial Activity. J. Industrial Science and Technology. Kon-Kuk University. 31, 11 (2006).
13. Y. K. Park, W. K. Whang, I. H. Kim. The Antidiabetic Effects of from Cornus officinalis Seed. Chung-Ang J. Pharm. Sci. 9, 5 (1995).
14. K. I. Seo, S. W. Lee, K. H. Yang. Antimicrobial and Antioxidative Activities of Corni Fructus Extracts. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 6(1), 99 (1999).
15. Y. H. Jeon, M. H. Park, Meera Kim. Antibacterial Activity of the Ethanol Extract from Cornus officinalis against Some Bacteria Related to Foodborne Illness and Food Spoilage. J. East Asian Soc

Dietary Life. 22(5), 692 (2012).
16. H. J. Jeon, M. J. Kim. Comparative studies on nutrients in Lycii Fructus and Corni Fructus by the different Drying Methods. Sook Myung Womens University. 10, 81 (1995).
17. C. H. Park, N. S. Soeng, S. T. Lee, K. B. Youn, S. G. Son. Studies on Multiplication of Cornus officinalis by in vitro Culture. Korean J. Medical Crop Sci. 1(1), 63 (1993).
18. S. O. Lee, S. M. Han, H. M. Kim, S. K. Jeung, J. Y. Choi, I, J, Kang. Chemical Components and Antimicrobial Effects of Corni fructus. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 35(7), 891 (2006).
19. Mann. C. M. and J. L. Markham. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Appl. Microbiol.* 84, 538-544 (1998).
20. Farrinton. J. K. E. L. Martz. S. J. Wells. C. C. Ennis. J. Holder. J. W. Levchu. K. E. Avis. P. S. Hoffman, A. D. Hitchins. and J. M. Madden. Ability of laboratory methods to predict in-use efficacy of antimicrobial preservatives in an experimental cosmetic, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4553-4558 (1994),
21. Y. D. Kim, H. K. Kim, K. J. Kim. Antimicrobial Activity of Solvent Fraction from Cornus officinalis. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32(6), 829~832 (2003).
22. J. S. Ko. Antimicrobial Coating Agent. J. of Korean Oil Chemists' Soc., 30(1), 96 (2013).
23. J. M. Lee, S. S. Heo. Isolation and Identification of Antifungal Compounds from Eugenia caryophyllata Extracts. J. of Korean Oil Chemists' Soc., 31(4), 740 (2014).
24. W. G. Cho, H. J. Kim. Microbiological Effects of Xanthorrhizol against Candida albicans. J. of Korean Oil Chemists' Soc., 27(1), 37 (2010).